



**PENENTUAN FAKTOR ESTIMASI JUMLAH TROMBOSIT
PADA SEDIAAN APUS DARAH TEPI
PASIEN TROMBOSITOPENIA**

Oleh :

Enny Rohmawati

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I (PPDS I)
BAGIAN PATOLOGI KLINIK FK UNDIP / RS DOKTER KARIADI
SEMARANG**

2003

**PENENTUAN FAKTOR ESTIMASI JUMLAH TROMBOSIT
PADA SEDIAAN APUS DARAH TEPI
PASIEN TROMBOSITOPENIA**

**Karya ilmiah akhir
Untuk memenuhi persyaratan
Program Pendidikan Dokter Spesialis-I
Patologi Klinik**

**Pada
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

**Oleh :
Enny Rohmawati**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS (PPDS-I)
BAGIAN PATOLOGI KLINIK FK UNDIP / RS Dr KARIADI
SEMARANG**

2003

Karya ilmiah ini telah disetujui untuk dipertahankan

Di hadapan tim penguji

PPDS I Patologi Klinik FK UNDIP

Telah disetujui:


Pembimbing I



Dr. Purwanto AP, SpPK

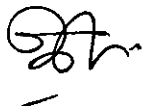
NIP 131 252 963

Pembimbing II



Dr. AP Pradana, SpPK(K)

**Ketua Bagian Patologi Klinik
FK UNDIP**



Dr. Purwanto AP, Sp. PK

NIP. 131 252 963

**Ketua PPDS – I Patologi Klinik
FK UNDIP**



Dr. Lisyani Suromo, Sp. PK (K)

NIP. 130 354 869

DETERMINATION OF THE ESTIMATION FACTOR OF PLATELETS NUMBER IN PERIPHERAL BLOOD SMEAR FROM THROMBOCYTOPENIC PATIENTS

Enny Rohmawati, Purwanto AP, AP Pradana

ABSTRACT

Backgrounds: Accurate platelet count in thrombocytopenia is essential due to its close association with risk of hemorrhage. Despite of sophisticated instrumentation, the errors in platelet count can't be avoided, so it must be crosscheck to know the difference of platelet count and estimation of platelets number in peripheral blood smear. The estimation factor of platelets number in thrombocytopenic patients will be accurate if it is determined on the basis of several samples of thrombocytopenia and many equipments in the laboratory, especially field number of microscope.

Objectives: To determine accurate estimation factor for patients with thrombocytopenia according to instruments used in the Clinical Pathology laboratory at Dr Kariadi Hospital, that is Sysmex KX-21 and FN 18 microscope.

Materials and Methods: 75 samples of thrombocytopenia determined by Sysmex KX-21, followed by preparation of peripheral blood smear from each sample for determining the average platelets number per field using 100x objective from 10 fields in zone V. This was followed by determination of ratio of automatic platelet count to the average platelets number per field for each sample. The estimation factor is total ratio obtained divided by number of samples.

Results: The results of platelet count have a range of $14-140 \times 10^9/L$, and the distribution is mostly (48%) in group with the platelets number $>100-150 \times 10^9/L$. The mean value of platelets per field is 4,420 with SD of 1,557. The total ratio from all samples is 1654, then it is divided by the number of samples, i.e. $1654:75 = 22$. So, the obtained estimation factor of platelets number is 22. It means that 1 platelet perfield is $22 \times 10^9/L$.

Conclusion: Estimation factor of platelets number is 22 in peripheral blood smear from thrombocytopenic patients, based on Sysmex KX-21 and FN 18 microscope examination.

Suggestion: Estimation factor of platelets number in peripheral blood smear can be used to reporting platelet count if the equipment is not available. It should be in accordance with the FN microscope.

Keyword: *estimation factor, platelet count, thrombocytopenia.*

PENENTUAN FAKTOR ESTIMASI JUMLAH TROMBOSIT PADA SEDIAAN APUS DARAH TEPI PASIEN TROMBOSITOPENIA

Enny Rohmawati, Purwanto AP, AP Pradana

ABSTRAK

Latar Belakang : Pemeriksaan hitung trombosit yang akurat untuk trombositopenia sangat diperlukan karena berkaitan erat dengan risiko perdarahan. Beberapa kesalahan hitung trombosit tidak dapat dihindari meski pada alat yang canggih sekalipun, sehingga harus dilakukan *cross check* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara hasil hitung dan estimasi jumlah trombosit pada sediaan apus darah tepi (SADT). Faktor estimasi jumlah trombosit pada pasien trombositopenia akan lebih tepat apabila ditentukan berdasarkan sejumlah sampel trombositopenia dan peralatan yang ada di laboratorium, terutama *field number*(FN) dari mikroskop.

Tujuan : Menentukan faktor estimasi yang tepat untuk pasien trombositopenia sesuai peralatan yang digunakan di laboratorium Patologi Klinik RS Kariadi yaitu Sysmex KX-21 dan mikroskop FN 18.

Bahan dan Cara : Penelitian ini melibatkan 75 sampel trombositopenia, dilanjutkan dengan pembuatan SADT, untuk menentukan rerata trombosit perlapangan pandang objektif 100x dari jumlah trombosit 10 lapangan pandang di zona V. Selanjutnya ditentukan rasio jumlah dan rerata trombosit perlapangan pandang untuk masing-masing sampel. Faktor estimasi adalah total rasio yang diperoleh dibagi besar sampel.

Hasil : Hasil hitung trombosit berkisar antara $17-140 \times 10^9/L$, dengan distribusi terbanyak (48%) dari kelompok jumlah trombosit $>100-150 \times 10^9/L$. Nilai rerata trombosit perlapangan pandang yaitu 4,420 dengan simpang baku 1,557. Total rasio semua sampel adalah 1654, kemudian dibagi besar sampel sehingga ; $1654:75=22$. Jadi faktor estimasi jumlah trombosit yang diperoleh adalah 22, artinya 1 trombosit perlapangan pandang setara dengan $22 \times 10^9/L$.

Kesimpulan : Faktor estimasi jumlah trombosit pada SADT pasien trombositopenia dengan Sysmex KX-21 dan mikroskop FN 18 adalah 22.

Saran : Estimasi jumlah trombosit dapat dipakai untuk pelaporan hasil hitung trombosit bila tidak tersedia peralatan hitung trombosit, dengan faktor estimasi yang sesuai dengan FN mikroskop.

Kata kunci : *faktor estimasi, jumlah trombosit, trombositopenia*

RIWAYAT HIDUP

Nama : Enny Rohmawati, dr

Alamat : Mojolawaran RT01/II, Gabus, Pati

Tempat / Tanggal Lahir : Pati / 04 Januari 1971

Agama : Islam

Pangkat / Golongan : III B

NIP : 140 349 499

Nama orang tua : H. Moh Patmin dan Ibu Masrufah.

Riwayat Pendidikan : 1. Lulus SDN Mojolawaran II , Pati tahun '82
2. Lulus SMPN I Pati tahun 1985
3. Lulus SMAN Pati tahun 1988
4. Lulus FK UNDIP tahun 1995

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT atas rahmat dan ridloNya, sehingga karya akhir ini dapat terselesaikan dalam rangkaian tugas pendidikan di Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik di Fakultas Kedokteran UNDIP / RS Dr. Kariadi Semarang.

Ucapan terima kasih yang tulus kami haturkan kepada **dr. Purwanto AP, SpPK**, Kepala Bagian Patologi Klinik FK UNDIP sekaligus pembimbing karya akhir ini, yang selalu memberi motivasi, bimbingan dan saran dengan bijak dan sabar, dan **dr. AP Pradana SpPK(KH)**, pengajar sekaligus pembimbing karya tulis ini, yang dengan sabar selalu siap menyediakan waktu membimbing kami.

Rasa terima kasih yang dalam juga kami haturkan kepada ;

- **dr. Lisyani Suromo, SpPK (K)**, Ketua Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik FK UNDIP yang selalu memberi motivasi, bimbingan dan keteladanan dengan sabar dan tulus.
- **dr. Latiyani Djamil, SpPK (K)**, Kepala Instalasi Patologi Klinik RS Dr. Kariadi Semarang yang telah memberi bimbingan, kesempatan belajar dan menyelesaikan penelitian di laboratorium PK.
- **Staf pengajar di PPDS I**, para guru kami ; **dr. MI Tjahjati DM, SpPK**, **dr. Banundari RH, SpPK**, **dr. Imam Budiwiyo, SpPK**, **dr. Affandi Ichsan, SpPK(K)** dan **dr. Sabardiman, Sp. PK(K)**, yang selalu membimbing dan memotivasi kami.

- **Seluruh staf Instalasi dan bagian Patologi Klinik** yang tidak kami sebut satu persatu yang telah banyak membantu selama pendidikan.
- **Dr. Anggoro DB Sachro, SpA(K)DTM&H dan Prof. Dr. Kabul Rahman, SpK(K)** mantan Dekan dan Dekan FK UNDIP yang telah memberikan fasilitas dan kesempatan mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis I.
- **Dr. H. Gatot Suharto, Mkes.MMR**, Direktur RSUP Dr. Kariadi Semarang yang telah memberikan fasilitas dalam mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik.
- **Segenap tim penguji PPDS I Patologi Klinik FK UNDIP**, yang telah memberi kesempatan kami untuk mempertahankan tulisan ini.
- **Ayahanda tercinta** yang dalam sehat maupun sakit tak henti-hentinya memanjatkan doa untuk keberhasilan dan kebahagiaan kami. juga **ibu tercinta** yang dengan tulus dan sabar berdoa untuk kami. Semoga Allah SWT berkenan memberi panjang umur yang sehat, iman dan istiqomah.
- **Almarhumah nenek**, yang semasa hidupnya dengan tulus berdoa dan memberi bantuan moril-material untuk kelangsungan pendidikan kami. Semoga Allah SWT mengampuni semua kesalahan beliau dan memberi tempat yang baik.
- **Saudara-saudara saya** ; mas Nur-mbak Ida. Indah, Ratna dan keluarga besar H. Zawawi yang selalu memberi dukungan dan doa.
- **Rekan-rekan satu angkatan** (mbak Mimin, mbak Esti dan pak Farid) yang selalu memberi semangat, saran dan kritik yang membangun. Semoga kesuksesan dan kebahagiaan memayungi langkah kita selanjutnya.

- **Teman sejawat residen** di bagian Patologi Klinik yang telah banyak membantu selama pendidikan.
- **Semua pihak** yang tidak bisa kami sebut satu-persatu, yang turut membantu dan mendukung pendidikan kami selama ini.

Saran maupun kritik yang membangun dari pembaca sangat kami harapkan untuk perbaikan tulisan ini di masa mendatang, teriring permohonan maaf yang tulus bila selama menempuh pendidikan maupun pergaulan sehari-hari ada hal-hal yang kurang berkenan.

Semoga Allah SWT selalu melimpahkan berkat dan rahmatNya kepada kita semua. Amin.

Semarang, Juli 2003

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
ABSTRACT	iii
ABSTRAK	iv
RIWAYAT HIDUP	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Trombosit	5
2.1.1. Asal dan Fungsi Trombosit	5
2.1.2. Trombositopenia	6
2.1.2.1. Patofisiologi Trombositopenia	6
2.1.2.2. Trombositopenia dan Perdarahan	7

2.1.3. Cara Hitung Trombosit	9
2.1.3.1. Metoda Rees Ecker	9
2.1.3.2. Metoda Brecher cronkite	9
2.1.3.3. Metoda Fonio (Cara Tak Langsung)	10
2.1.3.4. Metoda <i>automatic cell counter</i>	10
2.1.4. Estimasi Jumlah Trombosit pada Sediaan Apus Darah Tepi ...	13
2.2. Sediaan Apus Darah Tepi	16
2.2.1. Kepentingan Sediaan Apus Darah Tepi	18
2.2.2. Teknik Pembuatan Sediaan Apus Darah Tepi	18
2.2.3. Pemakaian Antikoagulan EDTA	20
2.3. Mikroskop Cahaya	21
2.3.1. Lensa okuler	21
2.3.2. Luas Lapangan Pandang dan Faktor Konversi	22
2.3.3. Lensa objektif	22
2.3.4. Tabung optik dan stage	23
2.3.5. Kondensor dan diafragma iris	23
2.3.6. Sumber Cahaya	24
2.3.7. Pembesaran Total dan resolusi	24
2.4. Kerangka Teori	25
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	26
3.1. Rancangan Penelitian	26
3.2. Ruang Lingkup penelitian	26
3.3. Populasi	26

3.4. Besar Sampel	26
3.4.1. Kriteria Inklusi	27
3.4.2. Kriteria Eksklusi	27
3.5. Alat dan Bahan	28
3.6. Alur Pemeriksaan	29
3.7. Cara Kerja	30
3.6. Analisis Data	31
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	32
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	38
BAB VI. RINGKASAN	39
DAFTAR PUSTAKA	42

DAFTAR TABEL

1. Anjuran jumlah trombosit untuk menghindari komplikasi perdarahan	8
2. Hubungan antara jumlah trombosit perlapangan pandang dengan hitung trombosit secara langsung	15
3. Distribusi pasien menurut jenis kelamin dan umur	32
4. Diagnosis pasien sesuai formulir permintaan laboratorium	33
5. Distribusi jumlah trombosit pasien trombositopeni	34
6. Penentuan faktor estimasi jumlah trombosit berdasarkan rasio hitung trombosit dan rerata trombosit perlapangan pandang objektif 100x.....	36

DAFTAR GAMBAR

1. Diagnosis banding trombositopenia	7
2. Histogram trombosit	12
3. Zona-zona pada sediaan apus darah tepi	17
4a. Susunan eritrosit di zona V (objektif 100x)	35
4b. Susunan eritrosit di zona V (objektif 40x)	35
5. Gerombolan trombosit (<i>clumping platelets</i>) di zona VI-ekor	35
6. <i>Giant platelet</i> di zona IV-V.....	34

DAFTAR LAMPIRAN

1. Analisis data penentuan rerata trombosit.
2. Penentuan faktor estimasi jumlah trombosit berdasarkan rasio hitung trombosit dan rerata trombosit perlapangan pandang objektif 100 x.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG PENELITIAN

Trombositopenia berkaitan erat dengan risiko perdarahan, sehingga harus ditetapkan berdasarkan hitung trombosit yang cermat. Metode otomatis dengan teknik impedansi atau *light scattering* sampai sekarang dinilai mampu menghitung jumlah trombosit yang rendah secara cepat dan akurat,⁽¹⁾ meskipun masih terdapat beberapa keterbatasan antara lain; trombosit bergerombol (*clumping platelets*) dan *giant platelets* yang tidak terhitung sebagai trombosit dan adanya *non platelet particles*, seperti kotoran, pecahan eritrosit atau leukosit yang justru terhitung sebagai trombosit.^(1,2,3)

Kesulitan memperoleh hasil hitung trombosit yang tepat membuat para ahli tetap memerlukan sediaan apus darah tepi (SADT) untuk *crosscheck* hasil yang ada, seperti dilakukan Gill GE, dkk (2000) terhadap alat *fully automatic* Cell Dyn 4000 yang telah dilengkapi antibodi monoklonal.⁽²⁾ Dengan *crosscheck* dapat diketahui ada tidaknya perbedaan antara hasil dengan estimasi jumlah trombosit pada SADT. De Gruchy (1978) menganjurkan hal tersebut bila jumlah trombosit kurang dari $150 \times 10^9/L$, atas dasar risiko perdarahan.⁽⁴⁾

Menurut Ravel (1986), jumlah trombosit dapat diestimasi dengan terpercaya melalui SADT yang baik,⁽⁵⁾ dimana salah satu cirinya adalah terbentuk daerah baca yang baik. AP Pradana (1974) membagi sediaan apus darah tepi menjadi 6 zona, berdasarkan susunan populasi sel darah merah.⁽⁶⁾ Zona V terdiri

dari eritrosit yang bebas, merata, tidak bertumpuk (*overlapping*) dan berdesakan (*distorsion*), sehingga merupakan daerah yang tepat untuk memperkirakan jumlah sel sekaligus melihat morfologinya.⁽⁷⁾

Terrel JC (1998) menganjurkan setiap laboratorium menentukan faktor estimasi jumlah trombosit sesuai alat hitung otomatis dan *field number* (FN) mikroskop yang dipakai.⁽⁸⁾ FN menentukan luas lapangan pandang (*field of view diameter*) yang berpengaruh pada jumlah trombosit perlapangan pandang. Kebanyakan mikroskop mempunyai FN 18, sedangkan generasi baru sudah mulai memakai 20 atau 22.⁽⁸⁾

Selama ini estimasi jumlah trombosit ditentukan berdasarkan cara *Barbara Brown*, yaitu hasil perkalian rerata trombosit perlapangan pandang pembesaran objektif 100x dengan angka 20.000/mm³.⁽⁹⁾ Cara tersebut berlaku untuk jumlah trombosit normal, rendah maupun tinggi. Metode ini tidak mencantumkan cara hitung trombosit yang digunakan dan FN mikroskop yang dipakai.

Penelitian pendahuluan Enny R., dkk (2002) memperoleh faktor estimasi 18, berdasarkan 30 sampel dengan hitung trombosit normal dari alat hitung sel otomatis *Sysmex KX-21*, mikroskop FN 18 dan penentuan rerata trombosit yang dilakukan di zona V, VI dan ekor.⁽¹⁰⁾ Faktor tersebut diaplikasikan untuk menentukan estimasi jumlah trombosit pada SADT pasien trombositosis dan trombositopenia. Pada pasien trombositosis, diperoleh estimasi jumlah trombosit sesuai hasil hitung otomatis ($t=0,550$ dengan $p=0,587$), sedangkan pada trombositopenia lebih rendah ($t=7,078$ dengan $p<0,05$). Kemungkinan

penyebabnya adalah distribusi trombosit yang relatif jarang pada trombositopenia, sehingga akan lebih tepat bila faktor estimasi ditentukan sesuai kondisi tersebut.

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan dan pentingnya penentuan status trombositopenia yang tepat, penulis bermaksud menentukan faktor estimasi jumlah trombosit pada SADT pasien trombositopenia sesuai peralatan yang dipakai sehari-hari di laboratorium Patologi Klinik RS Kariadi, yaitu Sysmex KX-21 dan mikroskop FN 18. Daerah baca yang dipakai untuk penghitungan rerata trombosit yaitu zona V.

1.2. PERUMUSAN MASALAH

Dari latar belakang diatas permasalahannya adalah; berapa faktor estimasi jumlah trombosit yang tepat pada sediaan apus darah tepi pasien trombositopenia berdasarkan rerata trombosit di zona V dan peralatan yang dipakai khususnya di laboratorium Patologi Klinik FK UNDIP/RS Dr Kariadi (mikroskop *field number* 18 dan Sysmex KX-21).

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.2.1. Tujuan Umum

Menentukan faktor estimasi jumlah trombosit pada kasus trombositopenia.

1.2.2. Tujuan Khusus

1. Mendiskripsikan jumlah trombosit pasien trombositopenia ($<150 \times 10^9/L$).
2. Mendiskripsikan rerata trombosit perlapangan pandang di zona V SADT pasien trombositopenia dengan mikroskop FN 18.

3. Mendiskripsikan penentuan faktor estimasi jumlah trombosit pada SADT

berdasarkan total rasio jumlah trombosit terhadap rerata trombosit perlapangan pandang pembesaran objektif 100x mikroskop FN 18.

1.4. MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini diharapkan dapat :

1. Memberikan informasi yang lebih rinci untuk praktisi laboratorium dalam penentuan faktor estimasi.
2. Memberi informasi bagi peneliti lain untuk penelitian lebih lanjut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. TROMBOSIT

2.1.1. Asal dan fungsi trombosit

Trombosit berasal dari fragmentasi sitoplasma megakariosit, suatu sel sumsum tulang dengan ukuran paling besar. Megakariosit matang ditandai proses replikasi endomitotik inti dan makin besarnya volume sitoplasma. Pada akhirnya, terjadi replikasi inti lebih lanjut, sitoplasma menjadi granuler, dan selanjutnya trombosit dibebaskan. Setiap megakariosit menghasilkan sekitar 2000-4000 trombosit.⁽⁹⁾ Diferensiasi sel asal sampai dihasilkannya trombosit memakan waktu sekitar 10 hari.

Diameter trombosit berukuran 1-4 μm , mempunyai dinding mukopolisakarida yang berfungsi dalam reaksi adesi dan agregasi trombosit. Fungsi utama trombosit adalah pembentukan sumbat mekanis sebagai respon hemostatik normal terhadap luka vaskular. Proses pembentukan sumbat tersebut melalui adesi, pembebasan, agregasi dan fusi, serta aktivitas prokoagulannya.

Nilai normal trombosit bervariasi sesuai metode yang dipakai. Jumlah trombosit normal menurut Dacie adalah $150-400 \times 10^9/\text{L}$.⁽¹¹⁾ Harga normal yang lebih spesifik yaitu $140-340 \times 10^9/\text{L}$ bila dipakai metode Rees Ecker dan $150-350 \times 10^9/\text{L}$ dengan *Coulter counter*.⁽¹²⁾ *Sysmex KX-21* menetapkan nilai rujukan trombosit $128-434 \times 10^9/\text{L}$ untuk wanita dan $134-377 \times 10^9/\text{L}$ untuk laki-laki.⁽¹³⁾

Nilai rerata trombosit sekitar $250 \times 10^9/L$ dan jumlah pada setiap individu relatif konstan.⁽¹⁴⁾ Tidak terdapat perbedaan yang nyata antara laki-laki dan wanita. Secara fisiologis, variasi jumlah trombosit terjadi selama siklus menstruasi. Pada saat menstruasi terjadi penurunan jumlah trombosit, sedangkan saat ovulasi meningkat.^(11,14)

2.1.2. Trombositopenia

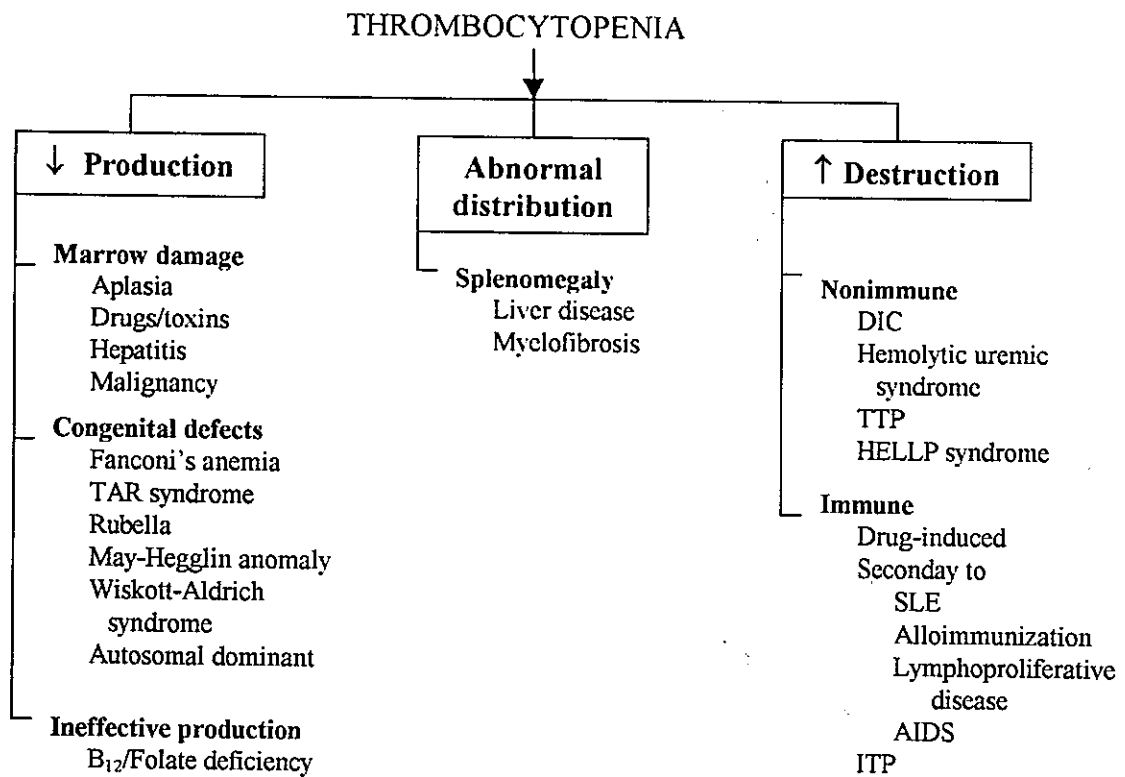
Trombositopenia adalah keadaan berkurangnya jumlah trombosit dibawah nilai normal yaitu kurang dari $150 \times 10^9/L$. Sumber lain menyebutkan kurang dari $100 \times 10^9/L$ disebut trombositopenia sedang dan dibawah $50 \times 10^9/L$ adalah trombositopenia berat.^(1,15)

2.1.2.1. Patofisiologi trombositopenia

Diagnosis trombositopenia didasarkan pada perubahan produksi trombosit, distribusi dalam sirkulasi dan destruksi trombosit.^(1,3,16,17) Gambar 1 menunjukkan diagnosis banding trombositopenia.

Sumber lain menyebutkan penurunan produksi trombosit merupakan penyebab tersering dari trombositopenia.⁽¹⁶⁾ Pada infeksi virus, trombositopenia terjadi akibat depresi megakariosit⁽¹⁶⁾, sedangkan *heparin-induced thrombocytopenia* (HIT) disebabkan peningkatan destruksi trombosit.^(16,18) Pada HIT, jumlah trombosit akan normal kembali dengan pemberian antikoagulan alternatif yang lebih aman.⁽¹⁹⁾

Levine SP juga memasukkan *artifactual thrombocytopenia* dalam klasifikasi sebab-sebab trombositopenia. Trombositopenia tersebut disebabkan adanya trombosit yang bergerombol, *platelet satellitism* dan *giant platelets*.^(3,20)



TAR syndrome	: congenital hipoplastic Thrombocytopenia with absent radia
DIC	: Disseminated Intravascular Coagulation
TTP	: Thrombotic Thrombocytopenic Purpura
HELLP syndrome	: Hemolysis Elevated Liver Enzyme Low Platelet count
SLE	: Sistemik Lupus Eritematosus
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
ITP	: Idiopathic Thrombocytopenic Purpura

Gambar 1. Diagnosis banding trombositopenia.

Dikutip dari; Hillmann RS, Ault KA (1998)⁽¹⁾

2.1.2.2. Trombositopenia dan perdarahan.

Trombositopenia erat kaitannya dengan komplikasi perdarahan. Manifestasi klinik ringan seperti petekie atau purpura dapat terlihat pada jumlah trombosit $50-150 \times 10^9/L$.^(1,4,15) Petekie berukuran kecil, berupa bercak perdarahan di kulit atau mukosa. Purpura ditandai dengan warna merah kehitaman yang lebih luas. Perdarahan spontan dapat terjadi pada jumlah trombosit $20-50 \times 10^9/L$,⁽²¹⁾ terutama pada pasien dengan trauma atau pembedahan. Jumlah trombosit kurang dari $20 \times 10^9/L$ akan mengakibatkan perdarahan yang berat khususnya bila terdapat penyakit lain yang mendasari.^(1,4) Ada juga pasien dengan trombositopenia ringan sampai berat tanpa perdarahan spontan meskipun sudah berlangsung lama.⁽⁴⁾ Sebenarnya tidak ada hubungan yang absolut antara jumlah trombosit dan beratnya perdarahan.⁽⁴⁾

Transfusi trombosit harus diberikan pada pasien trombositopenia berat dengan penyulit perdarahan atau terdapat penyakit lain yang mendasari. Para ahli menganjurkan transfusi trombosit profilaktik pada pasien AML (Acute Myeloid Leukemia) yang mendapat kemoterapi dengan jumlah trombosit $<20 \times 10^9/L$.⁽²²⁾

Seorang individu normal tanpa penyulit dapat bertoleransi pada jumlah trombosit $5-10 \times 10^9/L$.⁽¹⁾ Pada keadaan lain, pasien sepsis, keganasan, atau hamil akan mempunyai risiko perdarahan pada jumlah trombosit $20-30 \times 10^9/L$.⁽¹⁾ Untuk menghindari komplikasi perdarahan pada kondisi-kondisi tertentu, jumlah trombosit yang dianjurkan tercantum dalam tabel 1.

Tabel 1. Anjuran jumlah trombosit untuk menghindari komplikasi perdarahan

Number of platelets ($\times 10^9/L$)	Clinical condition
>100	Major surgery
>50	Trauma, minor surgery
>20	Prevention of bleeding in patient with sepsis, leukemia, malignancy
>5-10	Normal individuals
>5	ITP patients at low risk

Dikutip dari; Hillman RS, Ault KA(1998)⁽¹⁾

2.1.3.Cara Hitung Trombosit

Trombosit sukar dihitung karena kecil, mudah pecah dan sulit dibedakan dengan kotoran. Trombosit juga mudah melekat pada benda asing (adesif) dan cenderung saling menempel satu sama lain (agregasi). Pemeriksaan harus dilakukan sesegera mungkin dan dianjurkan memakai peralatan yang dilapisi silikon atau peralatan plastik.

Trombosit dapat dihitung secara langsung maupun tak langsung. Cara langsung dilakukan secara manual atau otomatis (*automatic cell counter*). Cara manual dapat dilakukan dengan metode Rees Ecker atau Brecher-Cronkite. Penghitungan tak langsung memakai cara Fonio.^(9,15)

Penentuan kuantitatif trombosit dengan cara otomatis sejauh ini masih dianggap paling akurat.⁽²³⁾ Hitung trombosit metode otomatis mempunyai koefisien variasi 4%, sedangkan manual 22%.⁽²⁴⁾

Macam-macam metode hitung trombosit yaitu ;

2.1.3.1. Metode Rees Ecker.

Darah diencerkan dengan larutan yang terdiri atas BCB (*Brilliant Cresyl Blue*), sehingga trombosit akan tercatat terang kebiruan. Trombosit dihitung dengan bilik hitung dibawah mikroskop.

2.1.3.2. Metode Brecher-Cronkite.

Darah diencerkan dengan amonium oksalat 1% yang melisiskan sel darah merah. Trombosit dihitung dengan hemositometer dan mikroskop fase kontras. Penggunaan amonium oksalat 1% lebih akurat dibanding formol sitrat dalam melisiskan sel darah merah.⁽²⁵⁾

Kedua cara diatas membutuhkan peralatan yang bersih dan kering. Darah dan reagen yang telah dicampur harus diperiksa sesegera mungkin.

Apabila hasil hitung trombosit rendah, pemeriksaan harus diulang dengan mengurangi pengenceran. Sebaliknya bila jumlah trombosit tinggi, pengenceran harus ditambah. Plasma kaya trombosit juga dapat dipakai untuk hitung trombosit yang dicurigai rendah.⁽²⁵⁾

Metode Rees Ecker mempunyai kemungkinan kesalahan 16-25%, sedangkan Brecher--Cronkite 8-10%.⁽⁹⁾ Kesalahan pokok dari hitung sel secara manual ini adalah dalam pengenceran dan penghitungan. Hasil yang telah diperoleh dari kedua cara di atas tetap harus dikonfirmasi dengan SADT.⁽⁹⁾

2.1.3.3. Metode Fonio (cara tak langsung)

Pemeriksaan ini untuk menghitung trombosit tak langsung. Mula-mula darah kapiler pada ujung jari dicampur dengan magnesium sulfat 14%, kemudian

dibuat SADT dan dilakukan pengecatan Giemsa. Jumlah trombosit dihitung dalam 1000 eritrosit. Cara ini lebih kasar dibanding cara langsung.

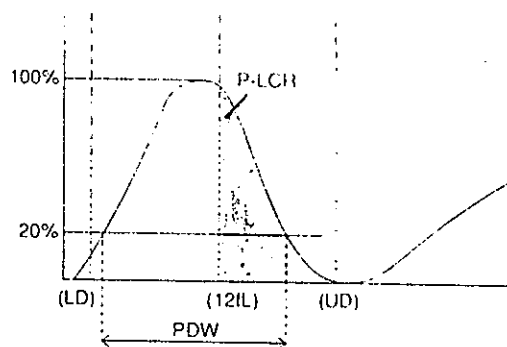
2.1.3.4. Metode *automatic cell counter*

Metode ini memakai prinsip *flow cytometry*. Prinsip tersebut memungkinkan sel-sel masuk *flow chamber* untuk dicampur dengan *diluent*, kemudian dialirkan melalui aperture berukuran kecil yang memungkinkan sel lewat satu persatu. Aliran yang keluar ini akan dilewatkan melalui medan listrik untuk kemudian dipisah-pisah sesuai muatannya (*cell sorting*).^(13,24)

Dua teknik dasar pengukuran sel dalam *flowcytometry* yaitu impedansi listrik (*electrical impedance*) dan pendar cahaya (*light scattering*).

Teknik impedansi listrik didasarkan pada pengukuran besarnya resistansi elektronik antara dua elektroda. Alat ini terdiri dari 2 ruang, 2 elektroda dan aperture. Ruangan yang ada tersebut akan terisi reagen yang bersifat konduktif. Pada saat pengukuran sampel, reagen dan sampel akan mengalir dari ruang 1 ke ruang 2 melalui aperture. Aliran ini terjadi karena perbedaan tekanan. Ruang 2 dihubungkan dengan *vacuum pump* yang diberi regulator agar tekanan yang dihasilkan juga stabil. Setiap sel yang melalui aperture akan mengakibatkan adanya perubahan arus yang mengalir yang diterjemahkan sebagai pulsa-pulsa elektronik. Pulsa-pulsa yang terjadi menggambarkan jumlah sel yang melewati aperture, sedangkan besarnya perubahan tegangan listrik (amplitudo) menggambarkan ukuran volume masing-masing sel. Trombosit dihitung dan dikalkulasi dengan menghitung pulsa dan variasi ukuran sel ditampilkan dalam bentuk histogram. Contoh alat yang memakai prinsip ini adalah Sysmex KX-21.

Pada Sysmex KX-21, histogram dianalisa dengan 3 diskriminator yaitu 2 batas bawah (*Low Discriminator/LD*) untuk ukuran 2-6 fL dan 1 batas atas (*Upper Discriminator/UD*) untuk 12-30 fL. Batas atas membedakan trombosit dari eritrosit, sedangkan batas bawah dari debu dan masa elektrik. Variasi ukuran trombosit dinyatakan dalam PDW (*Platelet Distribution Width*) dan P-LCR (*Large Platelet Ratio*) yaitu rasio antara jumlah trombosit yang berukuran 12-30 fL dan 2-30 fL. ⁽¹³⁾



Gambar 2. Histogram trombosit

Dikutip dari; Yukio T, 1999⁽¹³⁾

Kesalahan yang terjadi dalam hitung trombosit disebabkan oleh darah yang memjendal (*sample clotting*), trombosit bergerombol yang dihitung sebagai leukosit, trombosit bentuk besar dan *giant platelet* yang dihitung sebagai eritrosit, dan *platelets satellitism* (formasi *rosette* yang terbentuk dari trombosit-leukosit). ^(1,2,3) Keadaan tersebut menyebabkan jumlah trombosit lebih rendah dari sebenarnya. Sebaliknya, adanya *non platelet particles* seperti debu, pecahan

eritrosit dan pecahan leukosit dapat dihitung sebagai trombosit sehingga hasilnya tinggi palsu.⁽²⁾

Dengan *light scattering (optical)*, cahaya yang difokuskan pada sel akan dihamburkan, dipantulkan atau dibiaskan ke semua arah. Metode ini dinilai lebih terpercaya untuk menentukan hitung trombosit pada pasien defisiensi besi dengan mikrositosis.⁽²⁶⁾ Alat yang memakai prinsip ini adalah *Cell Dyn 4000*.

Flow cytometry generasi terakhir dilengkapi dengan teknik *immunoperoxidase* dan *immunophenotyping* sehingga menambah kemampuan menganalisa sel-sel darah.^(24,27) Pemakaian antibodi monoklonal yang spesifik untuk trombosit seperti CD41, CD42 dan CD61 diharapkan mampu mengurangi kesalahan.⁽²³⁾ Pengembangan *flow cytometry* akhir-akhir ini juga diarahkan untuk mengukur rata-rata produksi trombosit, menghitung agregasi trombosit, diagnosis *heparin induced thrombocytopenia*, dan lain-lain.⁽²⁸⁾

Houwen, dkk (1998) meneliti cara hitung trombosit berdasarkan rasio eritrosit terhadap trombosit yang ditentukan dengan *flow cytometry* generasi terakhir.⁽²⁹⁾ Dengan asumsi bahwa jumlah eritrosit absolut dapat dihitung, maka jumlah trombosit dapat ditentukan berdasarkan rasio eritrosit terhadap trombosit.^(29,30)

2.1.4. Estimasi jumlah trombosit pada sediaan apus darah tepi

Hitung trombosit harus dilakukan secara hati-hati terutama jika jumlahnya sedikit.⁽³¹⁾ Berbagai metode telah dikembangkan dari mulai manual dengan

mikroskop fase kontras sampai alat otomatis, meski kecenderungan terjadi kesalahan tetap ada.

Pada prinsipnya semua hasil hitung trombosit baik normal maupun abnormal yang diperiksa dengan alat hitung otomatis maupun manual harus dilakukan *crosscheck* pada SADT.⁽⁹⁾ De Gruchy (1978) berpendapat bahwa hasil hitung trombosit yang rendah harus dikonfirmasi dengan sediaan apus darah tepi, mengingat trombositopenia dapat berisiko perdarahan sehingga penetapannya harus dilakukan dengan hati-hati.⁽⁴⁾ *Crosscheck* pada SADT bertujuan mengetahui ada tidaknya perbedaan antara hasil hitung trombosit dengan jumlah trombosit secara estimasi.

Perbedaan mencolok antara hasil hitung trombosit dengan estimasi jumlah trombosit selain dapat disebabkan kesalahan alat hitung otomatis mengenali trombosit, juga perlu ditelusuri kemungkinan letak kesalahan dari proses praanalitik, analitik dan posanalitik. Kesalahan praanalitik misalnya sampel tertukar, kesalahan menulis identitas atau adanya bekuan pada sampel. Kesalahan analitik dapat disebabkan SADT yang tidak memenuhi persyaratan atau kerusakan alat hitung yang dipakai. Kesalahan posanalitik biasanya terjadi saat penulisan hasil hitung trombosit.

SADT untuk estimasi jumlah trombosit harus dibuat sebaik mungkin, sehingga terbentuk daerah baca yang baik. Trombosit harus terdistribusi rata dan tidak menggerombol. Apabila trombosit cenderung bergerombol, harus dibuat SADT baru, dengan terlebih dahulu memilin tabung berisi sampel darah secara adekuat sehingga EDTA tercampur dengan baik.⁽³²⁾ Sampel darah dari ibu

jari dapat digunakan, tetapi hasilnya kurang memuaskan dan secara bermakna menunjukkan jumlah trombosit yang lebih rendah dibanding darah vena.⁽⁹⁾

Secara umum, pada orang normal didapatkan 8-20 trombosit setiap pembesaran 100x,^(9,15) disamping ada juga pendapat lain seperti pada tabel 2. Menurut Barbara Brown, untuk mencari estimasi jumlah trombosit terlebih dahulu ditentukan jumlah trombosit sebanyak 5-10 lapangan pandang, pada daerah tipis dimana eritrosit tersusun bebas atau sedikit *overlapping*. Rerata yang diperoleh dikalikan dengan 20.000/mm³.⁽⁹⁾ Hasil perkalian tersebut merupakan jumlah trombosit secara estimasi. Sebagai contoh, apabila rerata trombosit = 10, maka estimasi jumlah trombosit = $10 \times 20.000 = 200.000/\text{mm}^3$. Metode ini berlaku untuk jumlah trombosit normal maupun abnormal, tetapi tidak dijelaskan alat hitung trombosit dan FN mikroskop yang dipakai.

Tabel 2. Hubungan antara jumlah trombosit perlapangan pandang dengan hitung trombosit secara langsung

Jumlah trombosit perlapangan pandang (pembesaran objektif 100x)	Hitung trombosit langsung ($\times 10^9/\text{L}$)
0 – 1	5
1 – 5	10 – 50
6 – 10	60 – 100
> 10	150 +

Dikutip dari : Koepke JA (1984)⁽³²⁾

Terrel JC (1998) menganjurkan penentuan faktor estimasi jumlah trombosit sesuai alat hitung dan *field number* (FN) mikroskop yang dipakai.⁽⁸⁾ Daerah baca SADT yang digunakan yaitu tempat dimana 50% susunan eritrosit sedikit *overlapping* (2-3 eritrosit). Faktor estimasi ditentukan berdasarkan rasio antara jumlah trombosit menurut alat yang dipakai dan rerata trombosit perlapangan pandang. Faktor estimasi adalah jumlah total rasio yang diperoleh dibagi besar sampel.

Ketepatan faktor estimasi tergantung juga pada kemampuan pemeriksa dalam mengidentifikasi trombosit pada SADT. Kemampuan ini dapat terasah dengan bekal pengetahuan dan latihan yang cukup. Estimasi jumlah trombosit yang diperoleh melalui pemeriksaan yang teliti dapat digunakan untuk pelaporan hasil hitung trombosit bila tidak tersedia peralatan hitung trombosit.⁽³³⁾

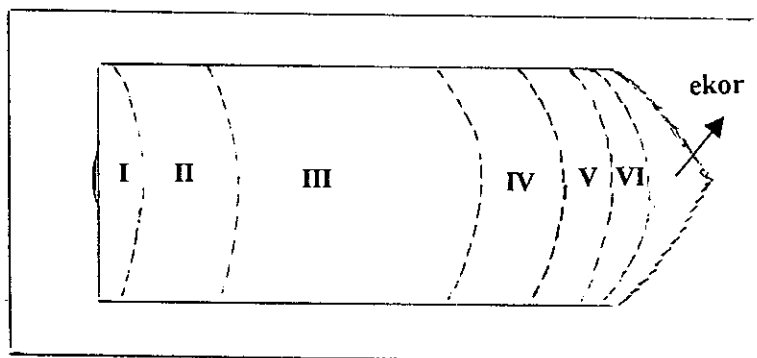
Selain menentukan estimasi jumlah trombosit, pemeriksaan morfologi trombosit juga dapat dilakukan pada SADT, contohnya, *giant platelet* sering ditemukan pada anomali May-Hegglin, sindroma mielodisplasia, dan AML.^(15, 34)

2.2. SEDIAAN APUS DARAH TEPI

Pemeriksaan SADT dapat memberikan informasi yang lebih banyak dibanding satu macam pemeriksaan hematologi. Pemeriksa harus teliti memilih daerah yang tepat sehingga mendapat gambaran dari semua seri sel darah.⁽²⁰⁾

AP Pradana membagi SADT menjadi 6 zona, berdasarkan susunan populasi sel darah merah, yaitu⁽⁶⁾ : zona I, II, III, IV, V dan VI (gambar 3). Zona I disebut zona ireguler. Didaerah tersebut distribusi sel darah merah tidak

teratur dan kadang ada yang padat bergerombol. Daerah ini meliputi kira-kira 3% dari seluruh badan SADT. Zona II disebut juga zona tipis, dimana distribusi sel darah merah tidak teratur, saling berdesakan (*distorsion*) dan bertumpuk (*overlapping*). Zona ini meliputi sekitar 14%, Zona III disebut juga zona tebal, dimana sel-sel darah merah bergerombol rapat dan padat. Luas zona ini sekitar 45% atau hampir separoh dari badan SADT. Zona IV disebut juga zona tipis, yang sama kondisinya dengan zona II, hanya lebih tipis. Luasnya sekitar 18% dari badan sediaan apus. Zona V atau zona reguler, merupakan tempat sel-sel tersebar rata, tidak saling bertumpuk dan bentuk-bentuknya masih asli. Daerah ini meliputi kira-kira 11% dari badan SADT. Zona VI disebut juga zona sangat tipis, terletak diujung sediaan apus sebelum ekor. Disini sel-sel tersusun lebih longgar, dan umumnya tersusun berderet. Zona ini luasnya sekitar 9% dari badan SADT.



Gambar 3. Zona-zona pada sediaan apus darah tepi

Dikutip dari ; AP Pradana (1974)⁽⁶⁾

Daerah yang cocok untuk pemeriksaan SADT menurut Miwa S adalah *suitable region* yang ditandai dengan distribusi eritrosit yang baik dan struktur 3 dimensinya dapat dicermati dengan baik pula (bagian tengah tampak terang).⁽³⁴⁾

2.2.1. Kepentingan Sediaan Apus Darah Tepi

SADT memberi informasi yang banyak, apabila pemeriksa mempunyai bekal pengetahuan yang cukup. Dengan pemeriksaan SADT hal-hal yang bisa dinilai, yaitu ;^(9,35)

1. Adanya parasit, sel asing atau ganas.
2. Seri eritrosit ; meliputi ukuran, bentuk, warna, benda-benda inklusi dan susunannya . Jenis atau derajat anemia dapat ditentukan dengan penilaian ini.
3. Hitung jenis lekosit, estimasi jumlah dan memperhatikan morfologi seri lekosit, sehingga dapat mengarahkan diagnosis misalnya, infeksi bakterial, virus atau keganasan hematologi.
4. Melakukan estimasi jumlah dan morfologi trombosit.

Ketrampilan dalam membuat sediaan yang baik, menjadi syarat penting dalam penilaian sediaan apus tersebut.

2.2.2. Teknik Pembuatan Sediaan Apus Darah Tepi

Bahan pemeriksaan untuk estimasi jumlah trombosit pada SADT yaitu darah vena yang ditambah dengan antikoagulan EDTA.⁽⁹⁾ Peralatan yang diperlukan untuk pembuatan SADT yaitu;

- kaca objek yang bersih, kering, bebas debu dan lemak serta permukaan rata.

- Penggeser atau *spreader*, dari bahan gelas atau bahan lain dengan tepi yang rata dan lebih sempit dari lebar kaca objek.

Cara Pembuatan SADT ;

- Darah (7-8 μ l) ditetaskan pada kaca objek, sekitar 1-1,5 cm dari salah satu sisi pendek.⁽³⁴⁾
- Penggeser diletakkan dengan membentuk sudut kurang lebih 30^0 , kemudian ditarik mundur sehingga menyentuh tetesan darah.
- begitu tetesan melebar, didorong kedepan sampai kepanjangan 2,5 – 3 cm. Kalau terlalu pendek, daerah yang cocok untuk pemeriksaan akan lebih sempit.
- sediaan apus dibiarkan kering di udara kamar.
- diberi identitas, nomor registrasi pasien dan nomor laboratorium pada bagian kepala, dengan menggunakan pensil supaya tidak hilang saat pengecatan.
- dilakukan pengecatan sediaan apus yang memenuhi syarat.

SADT yang baik memenuhi kriteria sebagai berikut;

- lebar dan panjangnya tidak memenuhi seluruh kaca objek.
- Mempunyai ketebalan yang cukup (tidak terlalu tebal atau tipis)
- Ujung atau ekornya tidak berbentuk bendera robek.
- Tidak berlubang-lubang karena kaca objek kurang bersih atau terdapat bekas lemak.
- Tidak terputus-putus karena gesekan yang ragu-ragu.

Pembuatan SADT secara otomatis sudah mulai dikembangkan, mulai proses pembuatan apusan, fiksasi, pengecatan dan pengeringan, seperti yang

diperkenalkan Cell-Dyn[®] SMS (*Slide Maker and Stainer system*).⁽³⁶⁾ Mengingat belum ada standart internasional yang mengatur tentang pembuatan SADT, maka evaluasinya dilakukan secara mikroskopis setelah melalui 4 proses tersebut.⁽³⁶⁾

2.2.3. Pemakaian antikoagulan EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*)

Pemberian antikoagulan perlu untuk menghitung sel darah dengan benar. Tanpa antikoagulan, trombosit akan beragregasi, sehingga mengesankan adanya trombositopenia. Antikoagulan EDTA relatif mempunyai efek yang minimal terhadap sel-sel darah. EDTA yang dipakai berkonsentrasi 1 mg/1 ml darah atau 0,1 ml dari larutan 10% untuk 10 ml darah.⁽⁹⁾

Keuntungan-keuntungan EDTA yaitu,⁽⁹⁾

- mencegah formasi artefak
- dapat digunakan untuk pembuatan SADT (maksimal 2 jam setelah pengambilan)
- mencegah trombosit bergerombol.

Meskipun secara umum EDTA tidak mempengaruhi sel-sel, ada juga keadaan tertentu dimana terjadi pseudotrombositopenia karena antikoagulan.⁽³⁷⁾ Keadaan ini disebabkan terbentuknya kompleks imun antara trombosit dan EDTA. Pada hitung trombosit dengan alat hitung otomatis ditemukan trombositopenia dan setelah dilakukan pengecekan didarah tepi, banyak ditemukan trombosit yang bergerombol. Pemeriksaan diulangi dengan memakai antikoagulan Na Sitras 3%, dan hasil yang didapat ternyata normal.⁽³⁷⁾

Dalam praktek sehari-hari di laboratorium, lebih sering dipakai garam kalium EDTA dibanding garam natriumnya karena mudah larut. Jenis garam kalium tersebut adalah K2 EDTA (*Dipotassium Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) atau K3 EDTA (*Tripotassium Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*). Menurut Philips dkk (1998), tidak terdapat perbedaan bermakna antara keduanya terhadap hasil pemeriksaan darah dengan *hematology analyzers*.⁽³⁸⁾

2.3. MIKROSKOP CAHAYA

Secara umum mikroskop terdiri atas lensa, *mechanical stage*, sistem kondensor, diafragma iris dan sumber cahaya.^(9,39,40) Mikroskop cahaya terdiri atas 2 sistem lensa yaitu, lensa objektif dan okuler. Keduanya berperan dalam pembesaran spesimen yang diperiksa.

2.3.1. Lensa okuler

Lensa yang dekat mata disebut okuler atau *eyepiece*. Mikroskop monokuler terdiri atas 1 *eyepiece*, dan mikroskop binokuler terdiri 2 *eyepiece*. Kebanyakan okuler membesarkan spesimen dengan kekuatan 10 x, artinya okuler menguatkan diameter spesimen menjadi 10 x ukuran sebenarnya.

Pada lensa okuler ini, tercantum FN tertentu, sesuai karakteristik dari pabrik, misalnya 18, 20 atau 22.⁽³⁹⁾ FN ini dapat berbeda-beda antara mikroskop satu dengan yang lain. Berdasarkan FN tersebut, dapat diketahui *field of view diameter* dari suatu mikroskop. Kebanyakan mikroskop mempunyai FN 18, sedangkan mikroskop generasi terbaru sudah mulai memakai FN 20 atau lebih.

2.3.2. Luas Lapangan Pandang dan Faktor Konversi

Field of view adalah area dimana spesimen dapat dilihat. Semakin besar pembesaran objektif yang dipakai, akan menunjukkan area yang lebih kecil dengan gambar yang lebih detail. Diameter sebenarnya dari *field of view* dalam milimeter dapat dihitung dengan FN dibagi pembesaran objektif yang dipakai.⁽³⁹⁾ Apabila dipakai pembesaran objektif 100 x dengan FN 18, maka *field of view diameter* nya adalah $18/100=0,18$ mm. Perhitungan ini penting jika suatu laboratorium memakai 2 mikroskop dengan FN yang berbeda.

Untuk konsistensi pelaporan hasil estimasi jumlah sel, maka harus ditentukan faktor konversi mikroskop satu terhadap mikroskop yang lainnya. Faktor konversi untuk mikroskop dibuat berdasarkan luas lapangan pandang terkecil. Apabila terdapat 3 FN, yaitu; 18, 20 dan 22, maka FN 18 diasumsikan setara dengan 100%. Faktor konversi untuk FN 20 terhadap FN 18, yaitu; $0,18:0,20 = 0,9$ sedangkan untuk FN 22 terhadap FN 18, yaitu ; $0,18:0,22 = 0,81$. Semua hasil estimasi jumlah sel pada mikroskop FN tertentu harus dikalikan dulu sesuai faktor konversi yang diperoleh, sehingga diperoleh hasil yang setara antara mikroskop satu dan lainnya⁽³⁹⁾

2.3.3. Lensa objektif

Lensa objektif adalah lensa yang dekat dengan spesimen. Kebanyakan mikroskop cahaya terdiri atas 3 atau 4 lensa objektif, dengan kekuatan yang berbeda., yaitu 4x, 10x (kekuatan rendah), 40x (*high-dry*), dan 100x (*oil immersion*). Pembesaran 4x digunakan untuk melihat area SADT selayang

pandang, sebelum diperiksa dengan pembesaran yang lebih besar. Pembesaran 10x merupakan pembesaran lemah yang dapat digunakan untuk menilai area SADT selayang pandang atau langkah awal untuk fokus pada suatu objek tertentu. Pembesaran 40x sudah termasuk kekuatan yang besar. Pembesaran ini dipakai untuk menghitung sel darah, hitung jenis leukosit dan sedimen urin. Pembesaran 4, 10 dan 40 disebut pembesaran kering karena tidak membutuhkan minyak imersi. Pembesaran 100 x disebut juga pembesaran objektif minyak imersi. Minyak imersi merupakan lapisan antara spesimen dan objektif untuk merefraksikan sinar ke lensa. Minyak imersi relatif mempunyai kepadatan sedang, dan memiliki indeks refraksi yang sama seperti kaca.

2.3.4. Tabung optik dan *stage*

Panjang tabung optik yaitu jarak antara *eyepiece* dan lensa objektif, biasanya 160 mm.

Stage merupakan tempat diletakkannya *slide* yang akan diperiksa. *Stage* ini dapat digerakkan untuk memudahkan melihat bagian-bagian dari objek.

2.3.5. Kondensor dan diafragma iris

Kondensor dimaksudkan untuk mengarahkan cahaya dari sumbernya ke spesimen yang diperiksa.

Diafragma iris merupakan lembaran yang dapat dibuka atau ditutup untuk mengurangi atau menambah jumlah cahaya yang menyinari objek.

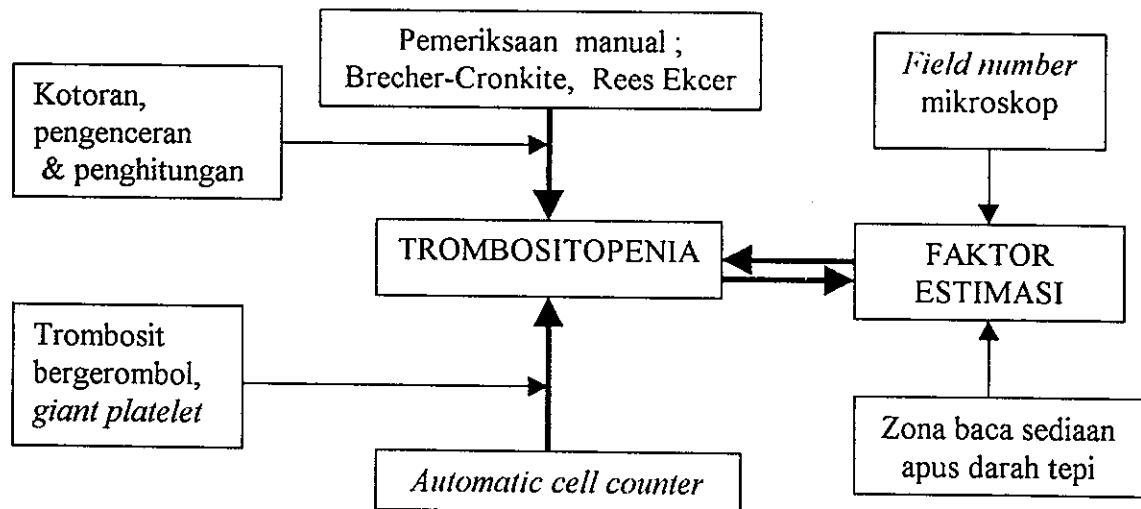
2.3.6. Sumber cahaya

Mikroskop yang lebih tua biasanya memakai cermin. Mikroskop baru memakai lampu yang ada pada mikroskop.

2.3.7. Pembesaran total dan resolusi.

Pembesaran total mikroskop merupakan hasil perkalian dari pembesaran okuler dan objektif. Sebagai contoh, bila menggunakan lensa okuler 10x, dan objektif 40x, berarti pembesaran totalnya 400x. Resolusi dari mikroskop adalah kemampuan mikroskop untuk membedakan detail yang baik dari objek yang diperiksa. Kemampuan ini tidak hanya ditentukan oleh kekuatan pembesaran tetapi juga kualitas mikroskop.⁽⁴⁰⁾

2.4. KERANGKA TEORI



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. RANCANGAN PENELITIAN

Rancangan penelitian ini memakai pendekatan belah lintang.

3.2. RUANG LINGKUP PENELITIAN

3.2.1. Lingkup Wilayah

Wilayah yang digunakan untuk penelitian yaitu bangsal rawat jalan dan inap RS Kariadi Semarang. Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik RS Kariadi Semarang.

3.2.2. Lingkup Waktu

Waktu penelitian selama 4 bulan, yaitu Februari 2003 sampai Mei 2003.

3.2.3. Lingkup Ilmu.

Bidang ilmu yang diteliti adalah ilmu patologi klinik dengan titik berat cabang ilmu hematologi.

3.3. POPULASI SAMPEL

Populasi penelitian ini adalah pasien rawat jalan dan inap RS Kariadi Semarang yang melakukan pemeriksaan hitung trombosit.

3.4. BESAR SAMPEL

Pengambilan sampel dilakukan secara purposif dengan memakai sampel darah pasien yang memenuhi kriteria inklusi.

Besar sampel ditentukan berdasarkan rumus sampel tunggal untuk perkiraan rerata, yaitu; ⁽⁴¹⁾

$$n = \left(\frac{Z\alpha \times S}{e \times X_o} \right)^2$$

dimana ditetapkan nilai $Z\alpha = 1,96$ (tingkat kemaknaan $\alpha = 0,05$)

$S=3,47$ (berdasarkan penelitian pendahuluan)

$e = 4\%$ (ketepatan relatif yang ditentukan peneliti)

$X_o = 20$ (nilai rerata standart)

$$n = \left(\frac{1,96 \times 3,47}{0,04 \times 20} \right)^2$$

$$n = 72,27 \approx 72$$

Untuk mengantisipasi sampel *drop out*, ditambahkan sampel sejumlah 10%, sehingga jumlah seluruhnya 80.

3.4.1. Kriteria Inklusi

Semua sediaan apus darah tepi dari sampel darah pasien trombositopenia ($<150 \times 10^9/L$) yang ditentukan dengan Sysmex KX-21. Sampel darah tidak mengandung bekuan, berasal dari pasien laki-laki dan wanita dari semua umur.

3.4.2. Kriteria Eksklusi

Pada SADT terdapat trombosit yang bergerombol dan atau *giant platelet*.

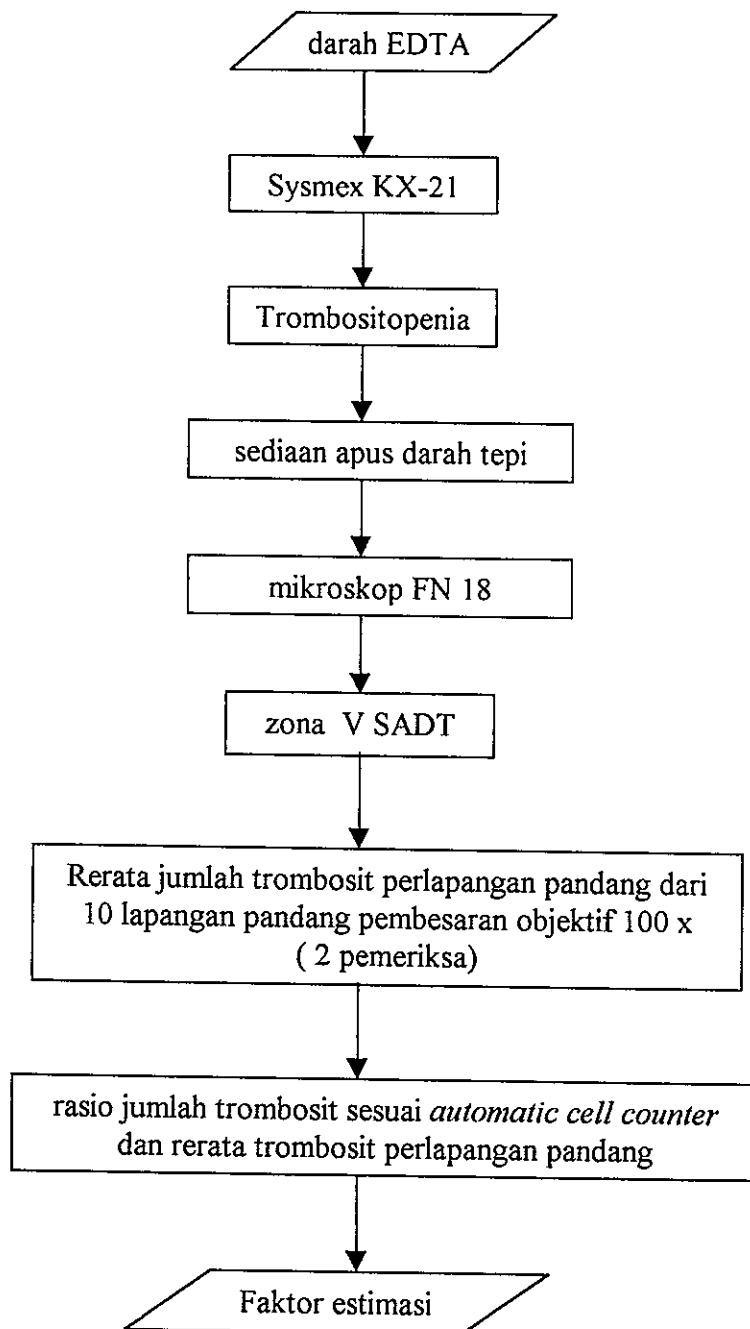
3.5. ALAT DAN BAHAN

Alat dan bahan yang digunakan meliputi :

- Darah vena yang ditampung dalam tabung EDTA sebanyak 2 cc.
- Spuit 3 cc, kapas alkohol dan pembendung (torniket).
- Tabung steril berisi K2EDTA 2 tetes dengan identitas dan nomor laboratorium.
- *Automatic cell counter*, yaitu Sysmex KX-21.
- Alat untuk pembuatan SADT, kaca objek bersih dan bebas lemak, *spreader*, pipet otomatis 10 μ L dan tip.
- Bahan pengecatan, yaitu : cat Giemsa (stok) yang telah diencerkan 1: 9, metanol dan air suling.

(Giemsa stok dibuat dari Giemsa serbuk (dari Merck[®]) sebanyak 0,76 g yang dilarutkan dalam 50 ml Gliserol pada suhu 60°C dan 50 ml Methanol, kemudian disaring).
- Mikroskop Olympus CH₂ *field number* 18.

3.6. ALUR PEMERIKSAAN



3.7. CARA KERJA

3.7.1. Sampling darah vena

Darah vena diambil dari daerah vena mediana cubiti dengan spuit sebanyak 2 cc. Sebelumnya daerah tersebut didesinfeksi dengan alkohol. Darah dimasukkan dalam tabung berisi EDTA dengan cara dilepas jarumnya dan dialirkan pelan-pelan. Setelah itu tabung dipilin untuk mencampur EDTA dengan darah.

3.7.2. Pemeriksaan hitung Trombosit

Tabung berisi darah EDTA ditempatkan sesuai tempatnya pada alat *hematology analyzer* Sysmex KX-21, sehingga darah akan diaspirasi oleh *probe* dan masuk dalam *sample rotor valve*. Larutan pengencer (*diluent*) juga mengalir dalam *sample rotor valve*, sehingga keduanya tercampur. Sampel yang telah diencerkan tersebut menuju ke *mixing chamber*. Proses ini adalah pengenceran pertama. Dari *mixing chamber*, sampel akan masuk kembali ke *sample rotor valve* dan bercampur kembali dengan larutan pengencer (pengenceran kedua). Sampel diaspirasi melalui aperture kedalam *transducer chamber*. Trombosit akan dihitung dengan metoda DC (*Discrimination Circuit*) dan ditampilkan dalam kertas *print out*.

3.7.3. Pembuatan sediaan apus darah tepi

Apabila jumlah trombosit $<150 \times 10^9/L$, dari sisa sampel yang ada dibuat sediaan apus darah tepi. Darah diisap dengan pipet otomatis 10 μL kemudian ditetaskan pada kaca objek. Selanjutnya dibuat apusan darah sebaik mungkin. Setelah apusan kering, ditetesi dengan metanol untuk fiksasi dan dibiarkan selama

2-3 menit. Selanjutnya digenangi larutan Giemsa selama 5 menit, dibilas dengan air suling dan dibiarkan kering di udara terbuka.

3.7.4. Penentuan rerata trombosit pada sediaan apus darah tepi.

Sediaan apus darah tepi yang telah siap diperiksa dibawah mikroskop *field number* 18. Jumlah trombosit dihitung di zona V dimana eritrosit tersusun rata memenuhi lapangan pandang, sebanyak 10 lapangan pandang., kemudian ditentukan reratanya. Penentuan rerata trombosit pada sediaan apus darah tepi dilakukan oleh 2 pemeriksa.

3.7.5. Penentuan Faktor Estimasi

Dari masing-masing sampel, ditentukan rasio jumlah trombosit menurut alat hitung sel otomatis dan rerata trombosit. Hasil dari langkah tersebut, dijumlah seluruhnya dan dibagi jumlah sampel yang digunakan. Angka yang diperoleh merupakan **faktor estimasi**.

3.8. ANALISIS DATA

Data yang akan dianalisis dengan perangkat lunak SPSS PC versi 10,0 yaitu ; penentuan rerata trombosit oleh 2 pemeriksa menggunakan uji normalitas data Kolmogorov Smirnov dilanjutkan uji beda t berpasangan.

Faktor estimasi ditentukan secara manual berdasarkan rumus yang memperhitungkan jumlah trombosit sesuai *cell counter* dan rerata trombosit perlapangan pandang pembesaran objektif 100 x mikroskop FN 18.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian dilakukan di laboratorium Patologi Klinik RS Kariadi dengan jumlah sampel yang memenuhi persyaratan sebanyak 75.

Sampel diperoleh dari 40 pasien laki-laki dan 35 pasien wanita dengan umur berkisar antara 2 hari sampai 75 tahun. Pasien dewasa (umur >14 tahun) menduduki jumlah terbanyak (88%) dan paling sedikit pasien bayi (umur 0-1 tahun) sebanyak 3% (tabel 3).

Tabel 3. Distribusi pasien menurut jenis kelamin dan umur.

Jenis Kelamin	Laki-laki			Wanita		
	0-1	>1-14	>14	0-1	>1-14	>14
Usia (thn)	0-1	>1-14	>14	0-1	>1-14	>14
Jumlah	1	5	34	1	2	32
Prosentase	1,5%	6%	46%	1,5%	3%	42%

Diagnosis pasien sesuai formulir permintaan tertera pada tabel 4, dimana CRF (Chronic Renal Failure) menduduki sebab terbanyak. Pasien CRF pada penelitian ini menjalani hemodialisis kronik, sehingga trombositopenia disebabkan efek pemberian heparin (*heparin induced thrombocytopenia*).

Tabel 4. Diagnosis pasien sesuai formulir permintaan laboratorium.

Diagnosis	Jumlah	Prosentase
CRF	23	31%
DHF	8	9%
Sirosis Hepatis	6	8%
Sindroma nefrotik	2	3%
TB paru	2	3%
AIHA	2	3%
Lain-lain (DM, hipertensi, ITP, observasi pansitopenia, diagnosis tak ditulis)	32	43%

Penentuan faktor estimasi diawali dengan melakukan hitung trombosit, dilanjutkan pembuatan SADT untuk masing-masing sampel.

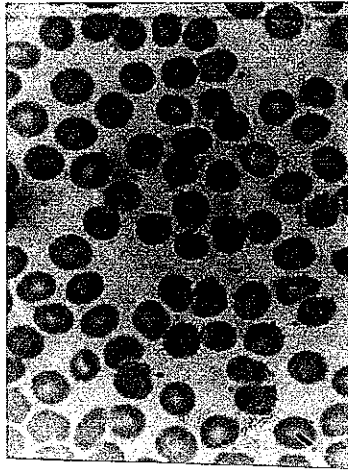
Hasil hitung trombosit terendah $17 \times 10^9/L$ dan tertinggi $140 \times 10^9/L$, 48 % diantaranya $<50-100 \times 10^9/L$. Derajat trombositopenia ini akan mempengaruhi tindakan yang diambil oleh klinisi karena berkaitan erat dengan berat ringannya komplikasi perdarahan. Pada umumnya hasil hitung trombosit $50- <150 \times 10^9/L$ mempunyai manifestasi klinik ringan seperti petekie atau purpura.^(1,4,15) Perdarahan spontan dapat terjadi pada jumlah trombosit $20-50 \times 10^9/L$,⁽²¹⁾ terutama pada pasien dengan trauma atau pembedahan. Jumlah trombosit kurang dari $20 \times 10^9/L$ akan mengakibatkan perdarahan yang berat khususnya bila terdapat penyakit lain yang mendasari.^(1,4)

Tabel 5. Distribusi jumlah trombosit pasien trombositopenia

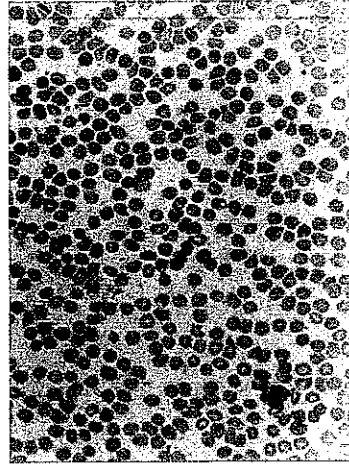
Jumlah trombosit ($\times 10^9/L$)	Jumlah pasien	Prosentase
<20	2	3%
20-50	8	11%
>50-100	29	38%
>100-<150	36	48%

Sebelum pembuatan SADT, tabung sampel darah terlebih dahulu dipilin sehingga trombosit terdistribusi dengan baik. Jumlah trombosit dihitung di zona V dimana eritrosit tersusun bebas dan tidak berdesakan atau bertumpuk (gambar 4) dengan pembesaran objektif 100x sebanyak 10 lapangan pandang. Adanya trombosit bergerombol dan atau *giant platelet* (gambar 5 dan 6) tidak dimasukkan dalam penelitian ini karena bentuk tersebut tidak terhitung oleh alat hitung otomatis.

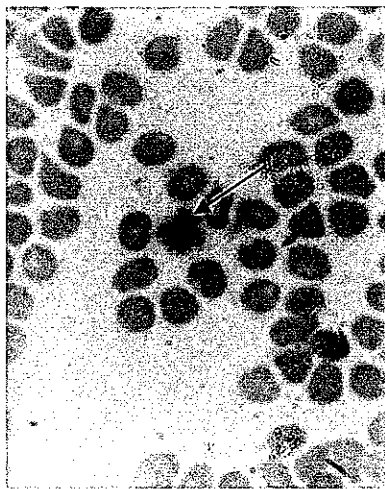
Nilai rerata trombosit yang diperoleh yaitu 4,420 dengan simpang baku 1,557. Dengan *uji beda paired t-test* antara 2 pemeriksa diperoleh hasil $p = 0,158$ dan $t = -1,428$. Jadi antara pemeriksa 1 dan 2 tidak berbeda secara bermakna. Data yang diperoleh berdistribusi normal berdasarkan uji normalitas data Kolmogorov-Smirnov .



Gambar 4a.



Gambar 4b.



Gambar 5.



Gambar 6.

Diambil dari : data primer penelitian

Keterangan:

Gambar 4a. Susunan eritrosit di zona V (objektif 100 x).

4b. Susunan eritrosit di zona V (objektif 40 x).

Gambar 5. Gerombolan trombosit (*clumping platelets*) di zona VI-ekor.

Gambar 6. *Giant platelet* di zona IV-V.

Hasil hitung trombosit dan rerata trombosit perlapangan pandang yang diperoleh ditampilkan pada tabel untuk mempermudah menentukan rasio antara keduanya (tabel 5, selengkapnya di lampiran 2).

Tabel 5. Penentuan faktor estimasi jumlah trombosit berdasarkan rasio hitung trombosit dan rerata trombosit perlapangan pandang objektif 100x.

No urut	Jumlah trombosit ($\times 10^9/L$) (a)	Rerata trombosit perlapangan pada SADT (b)	Rasio jml trombosit dan rerata trombosit (a/b)
1 dst	96	4,00	24,00

$$\text{Rumus faktor estimasi} = \frac{\text{Jumlah total rasio hitung trombosit terhadap rerata trombosit}}{\text{Besar sampel}}$$

$$\text{Berdasarkan perhitungan diperoleh ; } \frac{1654,01}{75} = 22,05 \approx 22$$

Jadi faktor estimasi untuk mikroskop FN 18 adalah 22, artinya 1 trombosit pada lapangan pandang objektif 100x setara dengan $22 \times 10^9/L$.

Faktor estimasi ini selanjutnya diaplikasikan untuk menentukan estimasi jumlah trombosit pada sediaan apus darah tepi pasien trombositopenia. Sebagai contoh; rerata trombosit perlapangan pandang = 5, maka estimasi jumlah trombosit $= 5 \times 22 \times 10^9/L = 110 \times 10^9/L$. Dari perhitungan tersebut dapat diketahui ada atau tidaknya perbedaan antara hasil hitung trombosit yang diperoleh dan estimasi jumlah trombosit. Apabila ada perbedaan yang mencolok antara

keduanya, maka harus diperhatikan adanya kemungkinan kesalahan alat dalam 'mengenali' trombosit, misalnya trombosit bergerombol, *giant platelets* dan sebagainya. Kemungkinan lain berasal dari proses praanalitik, analitik dan posanalitik. Kesalahan praanalitik misalnya sampel tertukar, kesalahan menulis identitas atau bekuan pada sampel. Kesalahan analitik dapat terjadi bila SADT tidak memenuhi persyaratan atau kerusakan alat hitung yang dipakai. Kesalahan posanalitik misalnya kesalahan penulisan hasil hitung trombosit.

Laboratorium yang memakai FN lebih besar dari 18 harus memakai angka konversi supaya hasil pemeriksaan setara dengan faktor estimasi yang telah diperoleh. FN 20 mempunyai angka konversi 0,9 terhadap FN 18, dan FN 22 mempunyai angka konversi 0,81. Sebagai contoh, bila dengan mikroskop FN 20 diperoleh rerata trombosit 5 perlapangan pandang, maka estimasi jumlah trombosit $= 0,9 \times 22 \times 5 \times 10^9/L = 99 \times 10^9/L$.

Estimasi jumlah trombosit dapat digunakan sebagai pelaporan hasil, apabila tidak tersedia alat hitung trombosit, dengan syarat dilakukan oleh pemeriksa yang memiliki bekal pengetahuan dan latihan yang cukup.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. KESIMPULAN

- 5.1.1. Jumlah trombosit dari 75 sampel pasien trombositopenia berkisar antara 17-140x10⁹/L.
- 5.1.2. Penentuan rerata trombosit perlapangan pandang objektif 100x di zona V dengan mikroskop FN 18 memperoleh nilai rerata 4,420 dengan simpang baku 1,557.
- 5.1.3. Faktor estimasi jumlah trombosit pada sediaan apus darah tepi pasien trombositopenia yang ditetapkan sesuai alat hitung Sysmex KX-21 dan mikroskop FN 18 yaitu 22.

5.2. SARAN

- 5.2.1. Laboratorium dapat memakai faktor estimasi 22 untuk menentukan estimasi jumlah trombosit dengan angka konversi sesuai FN mikroskop yang dipergunakan.
- 5.2.2. Estimasi jumlah trombosit dapat digunakan sebagai pelaporan hasil hitung trombosit apabila tidak tersedia fasilitas hitung trombosit.

BAB VI

RINGKASAN

Pemeriksaan hitung trombosit yang akurat, terutama untuk trombositopenia sangat diperlukan karena berkaitan erat dengan risiko perdarahan. Hitung trombosit secara otomatis sejauh ini dipercaya lebih akurat dibanding manual. Beberapa kesalahan hitung trombosit tidak dapat dihindari meski pada alat yang canggih sekalipun, karena ukuran sel yang kecil dan rentan suasana *in vitro*.

Kesulitan memperoleh hasil hitung trombosit yang tepat membuat para ahli tetap melakukan *cross check* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antara hasil yang ada dengan estimasi jumlah trombosit pada sediaan apus darah tepi (SADT). Perbedaan yang mencolok antara keduanya juga harus ditindaklanjuti dengan menelusuri sumber kesalahan, mulai dari praanalitik sampai posanalitik.

Penentuan faktor estimasi seharusnya menyesuaikan dengan peralatan yang dimiliki oleh suatu laboratorium, terutama *field number* (FN) mikroskop yang mempengaruhi luas lapangan pandang. Selama ini dipakai metode Barbara Brown, yaitu rerata trombosit perlapangan pandang dikalikan dengan faktor $20.000/\text{mm}^3$. Metode ini tidak mencantumkan FN mikroskop yang dipakai.

Penelitian pendahuluan tentang penentuan faktor estimasi yang dilakukan penulis mendapatkan angka $18 \times 10^9/\text{L}$ untuk setiap 1 trombosit perlapangan pandang objektif 100x dengan mikroskop FN 18. Faktor estimasi tersebut diperoleh dari sejumlah sampel trombosit normal dan diaplikasikan pada sejumlah sampel trombositopenia dan trombositosis. Estimasi jumlah trombosit pada sejumlah sampel trombositosis sesuai dengan hasil hitung trombosit menurut alat

otomatis ($t=0,550$ dengan $p=0,587$), sedangkan pada trombositopenia tidak sesuai ($t=7,078$ dengan $p<0,05$).

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan dan pentingnya penentuan status trombositopenia yang tepat, penelitian dilanjutkan untuk menentukan faktor estimasi jumlah trombosit pada SADT pasien trombositopenia. Faktor estimasi ditentukan berdasarkan sejumlah sampel trombositopenia sesuai peralatan yang ada di laboratorium Patologi Klinik RS Kariadi, yaitu mikroskop FN 18 dan *automatic cell counter* Sysmex KX-21.

Penelitian ini memakai 75 sampel trombositopenia, dilanjutkan dengan pembuatan SADT masing-masing sampel, untuk menentukan rerata trombosit perlapangan pandang pembesaran objektif 100x. SADT dibuat sebaik mungkin dengan trombosit yang tersebar merata. Trombosit yang bergerombol dan atau *giant platelet* tidak terhitung oleh alat hitung sel otomatis sebagai trombosit, sehingga tidak diikutkan dalam penelitian ini.

Hasil hitung trombosit berkisar antara $17-140 \times 10^9/L$, dengan distribusi terbanyak (48%) dari kelompok jumlah trombosit $>100-150 \times 10^9/L$. Rerata trombosit dihitung dari jumlah trombosit 10 lapangan pandang di zona V, dimana eritrosit tersusun rata dengan bentuk sempurna. Nilai rerata yang diperoleh yaitu 4,420 dengan simpang baku 1,557.

Faktor estimasi ditentukan dengan terlebih dahulu mencari rasio jumlah trombosit dan rerata trombosit perlapangan pandang. Total rasio semua sampel adalah 1654,01, kemudian dibagi dengan besar sampel, sehingga ; $1654,01 : 75 \approx 22$. Jadi faktor estimasi jumlah trombosit pada sediaan apus darah tepi pasien

trombositopenia sesuai mikroskop FN 18 adalah 22, artinya 1 trombosit pada lapangan pandang objektif 100 x setara dengan $22 \times 10^9/L$. Sesuai perhitungan, angka konversi untuk mikroskop FN 20 terhadap FN 18 yaitu 0,9 dan FN 22 adalah 0,81. Jadi estimasi jumlah trombosit untuk keduanya masing-masing harus dikalikan dulu dengan angka tersebut.

Estimasi jumlah trombosit dapat digunakan sebagai pelaporan hasil, bila tidak tersedia alat hitung trombosit dengan syarat dilakukan oleh pemeriksa yang berbekal pengetahuan cukup dan sudah terlatih.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hillman RS, Ault KA. Hematology in clinical practice, a guide to diagnosis and management. New York ; McGraw-Hill company, 1998: 437-57
2. Gill JE, Davis KA, Cowart WJ, et al. A rapid and accurate closed-tube immunoassay for platelets on an automated hematology analyzer. [on line] : URL <http://www.acip.com.html> , 2000.
3. Levine SP. Thrombocytopenia, pathophysiology and classification. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J. et al. eds. Wintrobe's clinical hematology 10th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993: 1579-82.
4. De Gruchy GC. The haemorrhagic disorders. In ; Penington D, Rush B, Castaldi P, eds. *Clinical haematology in medical practice*. Oxford ; The English Language Book Society and Blackwell Scientific Publications, 1982 : 646-51.
5. Ravel R. Clinical laboratory medicine, clinical application of laboratory data 4th ed. Chicago: Yearbook medical publishers, 1984: 70-3
6. AP Pradana. The reticulocyte count. *Majalah Kedokteran Diponegoro* 1974 ; 1; 26-33.
7. Kapff CT, Jandl JH. Blood atlas and sourcebook of hematology 2nd ed. Boston ; little, brown and company, 1991 : 4-5
8. Terrel JC. Laboratory evaluation of leukocytes. In; Stiene-Martin CA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA, eds. *Clinical hematology, principles, procedures, correlations* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott, 1990: 330-9

9. Brown B. Hematology, principles and procedurs 4nd ed. Philadelphia : Lea & Febriger, 1984 : 8-9, 59-63, 112-4.
10. Enny R, Purwanto AP, AP Pradana. Faktor estimasi jumlah trombosit pada sediaan apus darah tepi (penelitian pendahuluan). Diajukan di PIT I Patologi Klinik. Solo, 20-22 September 2002.
11. Dacie SJV, Lewis SM. Practical haematology 7th ed. Singapore ; Longman Singapore publishers ltd, 1991 : 13-6, 55-61.
12. Wallach J. Intrepretation of diagnostic test, a synopsis of laboratory medicine. Boston: Little Brown, 1992.
13. Yukio T. Operator's manual sysmex KX-21. Kobe; Sysmex Corporation, 1999.
14. Handin RI. Disorders of the platelet and vessel wall. In ; Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, eds. *Harrison's principles of internal medicine*. New York ; Mc Graw-Hill, 1998 : 730-5.
15. Turgeon ML. Quantitative platelet disorders clinical hematology, theory and procedurs 2nd ed. Boston ; Little, Brown and company, 1995: 273-5, 316-50.
16. Hoffbrand AV, Pettit JE. Haematologi. Alih bahasa; Iyan D. Jakarta : EGC, 1996:201-19.
17. Liesner RJ, Machin SJ. ABC of clinical haematology:platelet disorders. [online] URL <http://bmj.com> , 2000.
18. Kelton JG, Sheridan D, Santos A. Heparin-induced thrombocytopenia , laboratory studies. In; Brinkhous KM, Dalldorf FG, Grisham JW (eds).

- The year book of pathology and clinical pathology.* Chicago ; Year book of medical publishers, Inc. , 1990:326-7
19. Greinacher A, Volpel H, Janssens U, et al. Treatment of heparin-induced thrombocytopenia with recombinant hirudin results in recovery of platelet count and clinical benefit. *Annals of internal medicine* 2001; 134 ; 40.
 20. Jandl JH. *Blood, textbook of hematology.* Boston ; Little, Brown and company, 1996: 48-50, 1307-10.
 21. Murphy S. Platelet disorders ; hereditary and acquired. In : Mazza JJ (ed). *Manual of clinical hematology 2nd ed.* Boston ; Little, Brown and company, 1995: 190-5
 22. Rebulla P, Finazzi G, Marangoni F, et al. The threshold for prophylactic platelet transfusion in adults with acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 1997 ; 337 ; 1870-5. [on line] : URL www.nejm.com.
 23. Van Hove L. Defining a reference method for platelet count. *Labhem* 1998 ; 4 ; 97.
 24. Koeswardani R, Boentoro, Budiman D. Fow cytometry dan aplikasi alat hitung sel darah otomatis Technicon H-1 dan H-3. *Medika* 2001 ; 8 ; 524-30.
 25. Bain BJ. *Blood cells a practical guide 2nd ed.* Oxford : Blackwell science, 1995:21-2
 26. Pinkowski R. Impedance & optical platelet count methods & microcytosis. [on line] : URL <http://labhem.cjp.com>.
 27. Tietz NM, Finley PR. *Clinical guide to laboratory test.* Philadelphia ; WB Saunders company, 1983:392-3

28. Harrison P. The use of flow cytometry to investigate platelet disorders. *Lab hem* 1998 ; 4 ; 98.
29. Houwen B, Stewart N, Wang FS. Proposed reference method for whole blood platelet counting. In ; program XI th international simposium on technological innovations in laboratory hematology. Virginia : Garden jennings publishing company ltd, 1998:97
30. Kaplan SS, Johnson K, Wolfe N. Validation of low platelet counts from Culter LH 750 and Coulter Gen S analyzers. *Labhem* 2001 ; 7 ; 198-203.
31. Hansler E, Fehr J, Keller H. Estimation of the lower limits and autommated platelet counting. *Am J. Clin Path* 1996 ; 105 ; 782-7.
32. Koepke JA Guide to clinical laboratory diagnosis, 2nd ed. Iowa ; ACC, 1984:195-8
33. Purwanto AP. Estimasi jumlah sel beku darah cara sederhana menggunakan preparat darah apus. *Majalah penelitian Lemlit UNDIP* 1993 ; 19 ; 13-9.
34. Miwa S. Atlas of blood cells. Tokyo; Bunkodo Co, Ltd, 1998: 8-9, 21-2, 76-7.
35. Perkins SL. Examination of the blood and bone marrow. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J. et al. eds. *Wintrobe's clinical hematology 10th ed.* Baltimore: Williams & Wilkins, 1993: 17-22.
36. Tatsumi N, Tsuda I, Takubo T. Method to evaluate an automated slide marker and stainer system tested on CELL-DYN^R SMS. *Labhem* 1998 ; 4; 58-63.

37. Lavender RC, Salmon JS, Golden WE. Pseudothrombocytopenia in an elderly preoperative patient. In : Spivak JL, Bell WR, Ness PM, eds. *The year of hematology 1991*. MO ; St Louis Mosby year book, 1991 : 246-7.
38. Philip J, Corner J, Smith E et al. Performance of K2EDTA vs K3EDTA collected blood specimens on various hematology analyzers. *Labhem* 1998 ; 4; 17-20.
39. Smith Michael BA, Martin S, Lucas L. Basic microscopy in hematology. In; Stiene-Martin CA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA, eds. *Clinical hematology, principles, procedurs, correlations 2nd ed.* Philadelphia: Lippincott, 1990: 36-41.
40. Palko T, Palko H. Laboratory procedurs for the medical office. Westerville : Glencoe Division of Mc Graw Hill school publishing company, 1996 : 27-35.
41. Madiyono B, Moeslichan S, Sastroasmoro S. Perkiraan besar sampel. Dalam; Sastroasmoro S, Ismael S, eds. *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis*. Jakarta ; Sagung Seto, 2002 : 265-7.